

JP00/6566

101088907

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

E KU

REC'D 04 DEC 2000
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

2000年 7月12日

出願番号

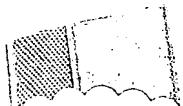
Application Number:

特願2000-211258

出願人

Applicant(s):

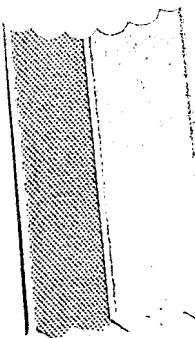
出光興産株式会社



**PRIORITY  
DOCUMENT**

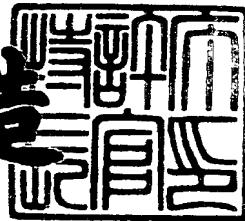
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月 6日



特許長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3083015

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 IK6100  
 【提出日】 平成12年 7月12日  
 【あて先】 特許庁長官殿  
 【国際特許分類】 C12N 1/00  
 【発明の名称】 難分解性ハロゲン化炭化水素の分解方法  
 【請求項の数】 6

## 【発明者】

【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市上泉1280番地  
 【氏名】 川端 孝博

## 【発明者】

【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市上泉1280番地  
 【氏名】 宮本 秀夫

## 【発明者】

【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市上泉1280番地  
 【氏名】 鈴木 源士

## 【特許出願人】

【識別番号】 000183646  
 【氏名又は名称】 出光興産株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100078732

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 大谷 保

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003137  
 【納付金額】 2,100円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1  
 【物件名】 要約書 1

特2000-211258

【包括委任状番号】 0000937

【プルーフの要否】 要

---

【書類名】 明細書

【発明の名称】 難分解性ハロゲン化炭化水素の分解方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 難分解性ハロゲン化炭化水素を、ラッカーゼ、リグニンペルオキシダーゼ及びマンガンペルオキシダーゼから選ばれる酵素及び／又は該酵素を生産する微生物と接触させることにより分解することを特徴とする難分解性ハロゲン化炭化水素の分解方法。

【請求項2】 難分解性ハロゲン化炭化水素が1～4個の炭素原子及び少な  
くとも1個のハロゲン原子からなるものである請求項1記載の分解方法。

【請求項3】 難分解性ハロゲン化炭化水素が、モノクロロメタン、ジクロロメタン、トリクロロメタン、テトラクロロメタン、モノクロロエタン、ジクロロエタン、トリクロロエタン、モノクロロエチレン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン及びトリクロロプロピレンから選ばれるものである請求項1記載の分解方法。

【請求項4】 難分解性ハロゲン化炭化水素がトリクロロエチレンである請求項1記載の分解方法。

【請求項5】 上記酵素を生産する微生物が、白色腐朽菌またはラッカーゼ生産菌である請求項1～4のいずれかに記載の分解方法。

【請求項6】 上記酵素を生産する微生物が、シゾフィラム (*Schizophyllum*) 属、プレウロタス (*Pleurotus*) 属、トラメテス (*Trametes*) 属、レンチナス (*Lentinus*) 属、フナリア (*Funalia*) 属、フィクノポラス (*Pycnoporus*) 属、メルリウス (*Merulius*) 属、ミセリオプトラ (*Myceliophthora*) 属、コプリヌス (*Coprinus*) 属、アガリクス (*Agaricus*) 属、フォリオタ (*Pholiota*) 属、フラムリナ (*Flammulina*) 属、ガノデルマ (*Ganoderma*) 属、ダエダレオプシス (*Daedaleopsis*) 属、ファボラス (*Favolus*) 属、リオフィラム (*Lyophyllum*) 属、オーリクラリア (*Auricularia*) 属またはリゾクトニア (*Rhizoctonia*) 属に属する微生物である請求項1～4のいずれかに記載の分解方

法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物を用いたトリクロロエチレン（TCE）などの難分解性のハロゲン化炭化水素の生物分解処理方法、特に、紙、パルプ工業、精密機械関連産業等において洗浄剤などとして用いられている難分解性ハロゲン化炭化水素を含む排水や廃液等の水性媒体の浄化、それによって汚染された土壤の修復、及び空気の浄化に有用な難分解性ハロゲン化炭化水素の分解方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、生体に対し有害かつ難分解性ハロゲン化炭化水素による環境汚染が大きな問題となってきている。特に、国内外の紙、パルプ工業、精密機械関連産業等工業地域の土壤中には、洗浄剤などとして用いられているテトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、ジクロロエチレン等の難分解性ハロゲン化炭化水素による汚染がかなりの範囲で拡がっていると考えられており、実際に環境調査等で検出された事例が多数報告されている。これらの難分解性ハロゲン化炭化水素は土壤中に残留したものが雨水等により地下水中に溶解して周辺地域一帯に拡がるとされている。これらの化合物には発癌性の疑いがあり、また環境中で安定であるため、特に飲料水の水源として利用されている地下水の汚染は深刻な社会問題となっている。

このようなことから、難分解性ハロゲン化炭化水素の除去、分解による、汚染地下水等の水性媒体、土壤、及びそれに伴う周辺気相の浄化は、環境保全の観点からきわめて重要な課題であり、浄化に必要な技術の開発（例えば、活性炭による吸着処理、光や熱による分解処理等）が行われてきてはいるものの、現状の技術はコストや操作性の面からかならずしも実用的であるとはいえない。

一方、環境中で安定であるTCE等の難分解性ハロゲン化炭化水素に対して近年微生物による分解が報告され、その利点として、1) 基本的に特別な薬品が不要であること、2) メンテナンスにかかる労力やコストを軽減できること、等が

挙げられている。

## 【0003】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、従来の微生物による分解方法においては、分解性において未だ十分でなく、また、地下深部に移行した難分解性ハロゲン化炭化水素の分解は、酸素の透過や菌の増殖特性から、困難であることから、優れた分解性を示す微生物及びこれを用いた効率のよい分解方法が望まれていた。

本発明は、トリクロロエチレン（TCE）などの難分解性のハロゲン化炭化水素あるいはその水溶液を、効果的に微生物または微生物生産酵素と接触させて上記ハロゲン化炭化水素を効率よく分解し無害化する方法を提供することを目的とする。

## 【0004】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を解決するために銳意研究を重ねた結果、難分解性のハロゲン化炭化水素を含有する排水や廃液等に対して、これらが地下に浸透する前に該難分解性ハロゲン化炭化水素の分解能を有する特定の微生物あるいは該微生物が生産する酵素を接触させることにより、上記難分解性ハロゲン化炭化水素を効率よく分解し、無害化することができることを見出し、これら知見に基づいて本発明を完成させるに至った。

## 【0005】

すなわち、本発明の要旨は、下記のとおりである。

- (1) 難分解性ハロゲン化炭化水素を、ラッカーゼ、リグニンペルオキシダーゼ及びマンガンペルオキシダーゼから選ばれる酵素及び／又は該酵素を生産する微生物と接触させることにより分解することを特徴とする難分解性ハロゲン化炭化水素の分解方法、
- (2) 難分解性ハロゲン化炭化水素が1～4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなるものである上記(1)記載の分解方法、
- (3) 難分解性ハロゲン化炭化水素が、モノクロロメタン、ジクロロメタン、トリクロロメタン、テトラクロロメタン、モノクロロエタン、ジクロロエタン、ト

リクロロエタン、モノクロロエチレン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン及びトリクロロプロピレンから選ばれるものである上記(1)記載の分解方法、

(4) 難分解性ハロゲン化炭化水素がトリクロロエチレンである上記(1)記載の分解方法、

#### 【0006】

(5) 上記酵素を生産する微生物が、白色腐朽菌またはラッカーゼ生産菌である上記(1)～(4)のいずれかに記載の分解方法、及び

(6) 上記酵素を生産する微生物が、シゾフィラム(*Schizophilum*)属、プレウロタス(*Pleurotus*)属、トラメテス(*Trametes*)属、レンチナス(*Lentinus*)属、フナリア(*Funalia*)属、フィクノポラス(*Pycnoporus*)属、メルリウス(*Merulius*)属、ミセリオプトラ(*Mycelioptora*)属、コプリヌス(*Coprinus*)属、アガリクス(*Agaricus*)属、フォリオタ(*Pholiota*)属、フラムリナ(*Flammulina*)属、ガノデルマ(*Ganoderma*)属、ダエダレオプシス(*Daedaleopsis*)属、ファボラス(*Favolus*)属、リオフィラム(*Lyophyllum*)属、オーリクラリア(*Auricularia*)属またはリゾクトニア(*Rhizoctonia*)属に属する微生物である上記(1)～(4)のいずれかに記載の分解方法。

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、生体にとって有害な難分解性ハロゲン化炭化水素を、ラッカーゼ、リグニンペルオキシダーゼ及びマンガンペルオキシダーゼから選ばれる酵素及び／又は該酵素を生産する微生物と接触させることにより分解する難分解性ハロゲン化炭化水素の分解方法である。

本発明の分解方法において、分解する難分解性ハロゲン化炭化水素とは、1～4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる有機化合物であり、具体的には、モノ、ジ、トリ、テトラハロゲン化メタン、1～5個のハロゲン原子を有するハロゲン化エタン、1～3個のハロゲン原子を有するハロゲン化エチレン、2～3個のハロゲン原子を有するハロゲン化プロピレン等が挙げられる。

## 【0008】

本発明においては、上記難分解性ハロゲン化炭化水素として、具体的には、モノクロロメタン、ジクロロメタン、トリクロロメタン、テトラクロロメタン、モノクロロエタン、ジクロロエタン、トリクロロエタン、モノクロロエチレン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、トリクロロプロピレン等が挙げられ、特に、トリクロロエチレンが好ましい。

## 【0009】

また、上記難分解性ハロゲン化炭化水素の分解能を有する微生物としては、ラッカーゼ、リグニンペルオキシダーゼまたはマンガンペルオキシダーゼを生産する微生物が用いられる。そして、これら酵素の生産をする微生物としては、白色腐朽菌またはラッカーゼ生産菌が好ましく用いられ、具体的には、シゾフィラム (*Schizophillum*) 属、プレウロタス (*Pleurotus*) 属、トラメテス (*Trametes*) 属、レンチナス (*Lentinus*) 属、フナリア (*Funalia*) 属、フィクノポラス (*Pycnoporus*) 属、メルリウス (*Merulius*) 属、ミセリオプトラ (*Myceliophthora*) 属、コプリヌス (*Coprinus*) 属、アガリクス (*Agaricus*) 属、フォリオタ (*Pholiota*) 属、フラムリナ (*Flammulina*) 属、ガノデルマ (*Ganoderma*) 属、ダエダレオプシス (*Daedaleopsis*) 属、ファボラス (*Favolus*) 属、リオフィラム (*Lyophyllum*) 属、オーリクラリア (*Auricularia*) 属、リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 属等に属する微生物が好適なものとして挙げられる。

## 【0010】

また、上記難分解性ハロゲン化炭化水素の分解能を有する微生物の生産酵素としては、ラッカーゼ、リグニンペルオキシダーゼまたはマンガンペルオキシダーゼが挙げられるが、これらの酵素としては、上記微生物が生産した酵素を酸沈殿やゲルろ過、イオン交換樹脂を用いる分離法などにより培養液から分離した酵素を用いることもできる。さらに、これら微生物の生菌体と、菌体の培養液から分離した酵素との混合物を用いることもできる。

上記菌体の培養液から分離した酵素を用いる場合には、この酵素の活性を最大

限発揮するためにメディエーターを添加することが好ましい。このメディエーターとしては、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールなどのフェノール性化合物や、2, 2' -アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)などのアニリン系化合物あるいはエトキシ脂肪酸等の不飽和脂肪酸が好適に用いられる。

## 【0011】

上記酵素を生産する微生物を培養する方法としては、通常の微生物の培養方法と同様の方法を用いることができる。例えば、少量の培養では、ポテトデキストロース液体培地、オートミール液体培地、あるいはふすま、米ぬか、木材チップ、大麦、イナワラ等を混合した固体培地を用いて行うことができ、実験室的には、ポテトデキストロース培地で5~10日間、20~40℃で培養するなどの方法が行われる。また大量に培養する場合には、タンクによる液体培養や、大麦や小麦の全粒やフスマなど植物由来の固体成分、糖のほか、窒素やリン、ミネラルなどを含浸させた無機多孔質担体などを用いて固体培養してもよい。

## 【0012】

上記微生物の培養においては、得られる培養物の菌濃度が、植物性有機物乾燥重量1gあたり、 $1 \times 10^2$  c f u (コロニー形成単位)以上、好ましくは $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^9$  c f u、より好ましくは $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$  c f uの範囲とする。上記濃度未満であると、これら微生物を上記難分解性ハロゲン化炭化水素含有水等に接種した際に、菌の繁殖の遅れを招く恐れがあるほか、既に存在する菌に対して接種した菌が優先的に繁殖させることが困難になることがある。また、これら菌の培養に際しては、菌糸体、胞子のいずれも使用できるが、通常は、培養が容易な菌糸体を用いる。

## 【0013】

このようにして得られた上記微生物やその生産物である酵素を用いて、排水中などに含まれている難分解性ハロゲン化炭化水素を分解するにあたっては、これらの接触温度を10~85℃、好ましくは20~50℃とする。ここで接触温度を10℃未満とすると、水の中での微生物の増殖が遅くなり、また酵素を用いる場合にもその作用が十分に発現されないことがある。また、この接触温度が8

5°Cを超えると、酵素が失活しやすくなる場合がある。

#### 【0014】

また、本発明に用いる難分解性ハロゲン化炭化水素含有水は、そのpHが3～11の範囲であるものが好ましく、さらに3.5～10.5の範囲に調整してあるものがより好ましい。これらのpHが3未満であると、酵素による反応が遅く、また、このpHが11を超えて酵素の反応が遅くなるほか、酵素が失活しやすくなる。したがって、これらのpHが3～11の範囲を外れている場合には、無機または有機の酸やアルカリ物質を添加してそのpHを調整し、酵素による反応を円滑に進行させるようにするのがよい。

#### 【0015】

##### 【実施例】

以下に、本発明を、実施例および比較例によりさらに具体的に説明する。

##### 【実施例1】

1リットル容の分液ロートに10ミリモルリン酸バッファー(pH7.4)を100ミリリットル入れ、1,1,2-トリクロロエチレンを20ppmとなるよう添加した後1時間振とうした。また、トラメテス・ベルシカラ(Trametes versicolor:IFO4941)をポリデキストロース液体培地で27°C、2週間液体静置培養した培養液を遠心分離し、上澄み液100ミリリットルを上記分液ロートに添加し、次いで、分液ロートの気相を純酸素で置換した後、これを40°Cの恒温室で4時間振とうした。

#### 【0016】

その後、1,1,2-トリクロロエチレンをガスクロマグラフィー質量分析(GC-MS)法により定量した。

同様に、上記において、培養液の上澄み液の代わりに水道水100ミリリットルを1,1,2-トリクロロエチレンを含む水道水に添加したものを対照区とし、これと比較して1,1,2-トリクロロエチレンの分解率を算出した。結果を第1表に示す。

##### 【実施例2】

実施例1において、1,1,2-トリクロロエチレンの代わりに1,1,1-

トリクロロエチレンを用いた以外は同様にして1, 1, 1-トリクロロエチレンの分解を行い、その分解率を測定した。結果を第1表に示す。

## 【0017】

## 〔実施例3〕

実施例1において、トラメテス・ベルシカラー (*Trametes versicolor*: IFO 4941) の代わりにシゾフィラム・コムネ [*Schizophyllum commune*; IFO 6505] を用いた以外は同様にして1, 1, 2-トリクロロエチレンの分解を行い、その分解率を測定した。結果を第1表に示す。

## 【0018】

## 〔実施例4〕

ペプトン5g、ショ糖20g及び溶性でんぶん20g/リットルで水道水に懸濁し、その100ミリリットルを500ミリリットル容のスリガラス口付マイヤーフラスコに入れ、シリコ栓で密栓後121℃で20分間殺菌した。この容器にリゾクトニア・プラティコラ (*Rhizoctonia puraticola*; ATCC 16129) を1白金耳接種し、27℃で14日間静置培養した。培養終了後、4℃の恒温振とう浴槽で冷却した後、これに1, 1, 1-トリクロロエチレン 10マイクロリットルを添加した。容器の口をガラスキャップに換え、4℃で10分間振とうし、1, 1, 1-トリクロロエチレンの含有量をガスクロマクグラフィー質量分析 (GC-MS) 法により定量した。この値を初期値とした。

その後、直ちに40℃の恒温振とう浴槽で4時間振とうした後、液体中の1, 1, 1-トリクロロエチレン含有量をガスクロマクグラフィー質量分析法により定量した。結果を第1表に示す。

## 【0019】

## 〔実施例5〕

実施例4において、リゾクトニア・プラティコラ (*Rhizoctonia puraticola*; ATCC 16129) の代わりにフナリア・ツロッギー [*Funalia trogii*; ATCC 200800] を用い、更に1, 1

、1-トリクロロエチレンの代わりに1, 1, 2-トリクロロエチレンを用いた以外は同様にして1, 1, 2-トリクロロエチレンの分解を行い、その分解率を測定した。結果を第1表に示す。

## 【0020】

## 〔実施例6〕

内容積500ミリリットルのマイヤーフラスコ5本に、それぞれ培地成分として、フスマ1.5gと、米ぬか1.5g、クヌギおが屑0.58g、硫酸銅・5水和物0.5mgを入れ、さらに水道水100ミリリットルを加えた。

ついで、これらフラスコに密栓をしてオートクレーブに入れ、121℃の温度において20分間殺菌した。

## 【0021】

この培地を室温に冷却した後、上記フラスコ5本にそれぞれラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [Trametes versicolor or : IF04941] を1白金耳接種し、温度25℃で3日間にわたり振とう培養をした。その後、温度25℃において10日間にわたり、静置培養した。

培養終了後、これら5本のフラスコ内の培養物を遠心分離することにより、上澄み液を得た。ついで、得られた上澄み液に、メディエーターとして1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを1ミリモルとなるように加え、さらに水道水を加えて全量を500ミリリットルとして、ラッカーゼ酵素液を調製した。

一方、内容積1リットルの分液ロートに、10ミリモルリン酸バッファー (pH8.5) を100ミリリットル入れ、気相を純酸素で置換した後、ジクロロメタンを50ppmとなるように添加し、10分間振とうした。

## 【0022】

つぎに、このジクロロメタン含有水に、上記調製したラッカーゼ酵素液1ミリリットルを加え、40℃の恒温振とう浴槽で4時間振とうして、ジクロロメタンのラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

反応終了後、反応液中に残存するジクロロメタンの量をガスクロマグラフィー質量分析 (GC-MS) 法により測定して、その分解率を算出した。

なお、上記においては、ラッカーゼ酵素液の代わりに水道水をジクロロメタン

含有水に添加したものを対照区とした。結果を第1表に示す。

【0023】

【実施例7】

実施例6において、ジクロロメタンの代わりに1, 1, 1-トリクロロエチレンを用いた以外は同様にして1, 1, 1-トリクロロエチレンの分解を行い、その分解率を測定した。結果を第1表に示す。

【0024】

【表1】

第 1 表

実施例	微生物の種類	難分解性炭化水素の種類	分解率 (%)
1	トラメテス・ベル シカラ (IFO 4941)	1, 1, 2-トリクロロエチ レン	49
2	トラメテス・ベル シカラ (IFO 4941)	1, 1, 1-トリクロロエチ レン	42
3	シゾフィラム・コ ムネ (IFO 6505)	1, 1, 2-トリクロロエチ レン	38
4	リゾクトニア・ブ ラティコラ (ATCC 16129)	1, 1, 1-トリクロロエチ レン	78
5	フナリア・ツロッ ギー (ATCC 200800)	1, 1, 2-トリクロロエチ レン	53
6	トラメテス・ベル シカラ (IFO 4941)	ジクロロメタン	28
7	トラメテス・ベル シカラ (IFO 4941)	1, 1, 1-トリクロロエチ レン	69

【0025】

【発明の効果】

本発明によれば、紙、パルプ工業、精密機械関連産業等において洗浄剤などとして用いられているトリクロロエチレン（TCE）などの難分解性ハロゲン化炭化水素を含む排水や廃液等を、例えば、これが地下に浸透する前に効果的に微生物または微生物生産酵素と接触させて上記ハロゲン化炭化水素を効率よく分解することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 トリクロロエチレン（TCE）などの難分解性ハロゲン化炭化水素を含む排水や廃液等を、例えば、これが地下に浸透する前に効果的に微生物または微生物生産酵素と接触させて上記ハロゲン化炭化水素を効率よく分解することができる。

【解決手段】 難分解性ハロゲン化炭化水素を、ラッカーゼ、リグニンペルオキシダーゼ及びマンガンペルオキシダーゼから選ばれる酵素及び／又は該酵素を生産する微生物と接触させることにより分解することを特徴とする難分解性ハロゲン化炭化水素の分解方法。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書  
【提出日】 平成12年 8月18日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2000-211258  
【補正をする者】

【識別番号】 000183646  
【氏名又は名称】 出光興産株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100078732  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 大谷 保  
【発送番号】 049539  
【手数料補正】  
【補正対象書類名】 特許願  
【予納台帳番号】 003171  
【納付金額】 21,000円  
【フルーフの要否】 要

出願人履歴情報

識別番号 [000183646]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

氏 名 出光興産株式会社